

# DELPHION

53221-2000623-10361



RESEARCH My Account

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

## The Delphion Integrated View

Get Now: ☒ PDF | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File: ☐ Create new Work File ☐ Add

View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to:  ☒ Go to: [Derwent](#) ☒ Email this to a friend

Title:

**DE10236631A1: Detecting cyclase-inhibiting parathormone (CIP), useful for differentiating parathyroid diseases, comprises reaction with a labeled antibody specific for CIP and measuring labeled antibody-CIP complex**[\[German\]](#)

Derwent Title:

Detecting cyclase-inhibiting parathormone (CIP), useful for differentiating parathyroid diseases, comprises reaction with a labeled antibody specific for CIP and measuring labeled antibody-CIP complex [\[Derwent Record\]](#)

Country:

DE Germany

Kind:

A1 Document Laid open (First Publication) <sup>1</sup>

Inventor:

Cantor, Thomas L.; Santee, CA, United States of America

Assignee:

Scantibodies Laboratory, Inc., Santee, Calif., United States of America  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 2003-07-17 / 2002-08-09

Application Number:

DE2002010236631

IPC Code:

G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/74; C07K 16/26

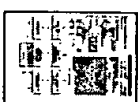
ECLA Code:

G01N33/78;

Priority Number: 2001-08-10 [US2001000928048](#)

Abstract:

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung der Anwesenheit oder der Menge des Cyclase-hemmenden Parathormons, das in einer klinischen Probe vorhanden ist. Derartige Bestimmungen sind nützlich, um parathyreoidale Erkrankungen wie Hyperparathyroidismus vom Normalzustand oder dem Zustand des Nierterkrankseins zu unterscheiden. Der Zielanalyt ist ein großes,



High Resolution  
10 pages

Best Available Copy

unvollständiges Parathormon-Peptidfragment, das als Cyclase-aktivierender Parathormon-Antagonist fungieren kann.

Attorney, Agent  
or Firm:

**Vossius & Partner** ; München 81675

INPADOC

None [Get Now: Family Legal Status Report](#)

Legal Status:

Family:

[Show 3 known family members](#)

Description

[Expand description](#)

**Technisches Gebiet**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung der Anwesenheit oder der Menge des Cyclase-hemmenden Parathormons, das in einer klinischen Probe vorhanden ist. Derartige Bestimmungen sind nützlich, um Erkrankungen der Nebenschilddrüsen wie Hyperparathyroidismus vom Normalzustand oder dem Zustand des Nichterkranktseins zu unterscheiden. Der Zielanalyt ist ein großes unvollständiges Parathormon-Peptidfragment, das als Cyclase-aktivierender Parathormon-Antagonist fungieren kann.

**Hintergrund des Fachgebiets**

**OFFENBARUNG DER ERFINDUNG**

**KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN**

**BESTE ART, DIE ERFINDUNG DURCHZUFÜHREN**

**Immuntests auf Cyclase-hemmendes PTH**

First Claim:

[Show all claims](#) 1. Verfahren zur Bestimmung des Cyclase-inhibierenden Parathormons (CIP) in einer Probe, umfassend:

- a) Zugabe eines markierten Antikörpers oder Antikörperfragments zu der Probe, der/das spezifisch ist für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet, in einer ausreichenden Menge, um das anwesende CIP zu binden;
- b) Ermöglichen der Bindung des markierten Antikörpers an jedes anwesende CIP, wobei ein Komplex erzeugt wird; und
- c) Messen der Menge an markiertem Komplex.

Foreign

None

References:

Other Abstract

[DERABS C2003-543119](#) [CHEMABS 139\(06\)079534X](#)

Info:



Nominate this for the Gallery...

THOMSON

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation



⑬ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 36 631 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 33/53**  
G 01 N 33/543  
G 01 N 33/74  
C 07 K 16/26

⑲ Aktenzeichen: 102 36 631.4  
⑳ Anmeldetag: 9. 8. 2002  
㉑ Offenlegungstag: 17. 7. 2003

DE 102 36 631 A 1

③④ Unionspriorität:  
928048 10. 08. 2001 US  
⑦① Anmelder:  
Scantibodies Laboratory, Inc., Santee, Calif., US  
⑦④ Vertreter:  
Vossius & Partner, 81675 München

⑦② Erfinder:  
Cantor, Thomas L., Santee, Calif., US

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤④ Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung des Cyclase-hemmenden Parathormons  
⑤① Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung der Anwesenheit oder der Menge des Cyclase-hemmenden Parathormons, das in einer klinischen Probe vorhanden ist. Derartige Bestimmungen sind nützlich, um parathyreoidale Erkrankungen wie Hyperparathyroidismus vom Normalzustand oder dem Zustand des Nichterkranktseins zu unterscheiden. Der Zielanalyt ist ein großes, unvollständiges Parathormon-Peptidfragment, das als Cyclase-aktivierender Parathormon-Antagonist fungieren kann.

Best Available Copy

DE 102 36 631 A 1

- 5 [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung der Anwesenheit oder der Menge des Cyclase-hemmenden Parathormons, das in einer klinischen Probe vorhanden ist. Derartige Bestimmungen sind nützlich, um Erkrankungen der Nebenschilddrüsen wie Hyperparathyroidismus vom Normalzustand oder dem Zustand des Nichterkranktseins zu unterscheiden. Der Zielanalyt ist ein großes unvollständiges Parathormon-Peptidfragment, das als Cyclase-aktivierender Parathormon-Antagonist fungieren kann.

10

## Hintergrund des Fachgebiets

- [0002] Calcium spielt eine unverzichtbare Rolle bei der Zellpermeabilität, bei der Knochen- und Zahnbildung, der Blutgerinnung, der Übertragung von Nervenimpulsen und der normalen Muskelkontraktion. Die Konzentration der Calciumionen im Blut wird zusammen mit Calcitriol und Calcitonin hauptsächlich durch das Parathormon (PTH) reguliert. Obwohl die Calciumaufnahme und die -abgabe variieren können, dient PTH durch einen Feedback-Mechanismus dazu, eine gleichmäßige Calciumkonzentration in den Zellen und den umgebenden Flüssigkeiten aufrechtzuerhalten. Wenn das Calcium im Serum abnimmt, sekretieren die Nebenschilddrüsen PTH, wobei die Freisetzung von gespeichertem Calcium beeinflusst wird. Wenn das Calcium im Serum zunimmt, wird die Freisetzung von gespeichertem Calcium durch eine erniedrigte Sekretion verzögert.

- [0003] Die vollständige Form des menschlichen PTH, manchmal im Fachgebiet als hPTH bezeichnet, aber in der vorliegenden Erfindung entweder als Gesamt-PTH oder CAP bezeichnet, ist ein einzelnes Peptid aus 84 Aminosäuren (SEQ ID NR. 3), wie in Fig. 1 dargestellt. Forscher haben herausgefunden, dass dieses Peptid einen anabolischen Effekt auf Knochen hat, wobei eine Domäne für die Proteinkinase C-Aktivierung (Aminosäurereste 28 bis 34) sowie eine Domäne für die Adenylatcyclaseaktivierung (Aminosäurereste 1 bis 7) beteiligt sind. Jedoch findet man verschiedene katabolische Formen abgespaltener oder fragmentierter PTH-Peptide im Blutkreislauf, die höchstwahrscheinlich durch den interglandulären oder peripheren Metabolismus erzeugt werden. Beispielsweise kann das vollständige PTH zwischen den Aminosäuren 34 und 35 gespalten werden, um ein N-terminales (1-34)-PTH-Fragment und ein C-terminales (35-84)-PTH-Fragment zu erzeugen. Genauso kann eine Spaltung zwischen den Aminosäuren 36 und 37 oder 37 und 38 erfolgen. Kürzlich wurde ein großes PTH-Fragment offenbart, das als "Nicht-(1-84) PTH" bezeichnet wird, das näher am N-terminalen Ende von PTH abgespalten wird. (Vgl. R. LePage et alia, "A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples" Clin Chem (1998); 44: 805-810).

- [0004] Der klinische Bedarf für eine genaue Messung von PTH ist gut demonstriert. Der Serum-PTH-Spiegel ist einer der wichtigsten Indices für Patienten mit den folgenden Krankheiten: familiäre Hypokalziurie; Hyperkalzämie; multiple endokrine Neoplasie Typ I und II; Osteoporose; Paget-Krankheit; primärer Hyperparathyroidismus, verursacht durch primäre Hyperplasie oder durch ein Adenom der Nebenschilddrüsen; Pseudohypoparathyroidismus und Nierenversagen, das sekundären Hyperparathyroidismus verursachen kann.

- [0005] PTH spielt bei einem Patienten mit chronischem Nierenversagen eine Rolle im Krankheitsverlauf. Renale Osteodystrophie (RO) ist eine komplexe Skeletterkrankung, umfassend Osteitis fibrosa cystica (verursacht durch einen PTH-Überschuss), Osteomalazie, die zu einer nicht mineralisierten Knochenmatrix führt (verursacht durch Vitamin D-Mangel), extraskelletale Kalzifikation/Ossifikation (verursacht durch anormalen Calcium- und Phosphormetabolismus) und adynamische Knochenkrankung (beigetragen durch PTH-Suppression). Patienten mit chronischem Nierenversagen können eine RO entwickeln. Versagende Nieren erhöhen das Serum-Phosphat (Hyperphosphorämie) und erniedrigen die 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-D)-Produktion durch die Niere. Das erstere führt zu sekundärem Hyperparathyroidismus aufgrund erniedrigter gastrointestinaler Calciumabsorption und Osteitis fibrosa cystica aufgrund des erhöhten PTH als Reaktion auf einen Anstieg beim Serum-Phosphor. Das letztere verursacht Hypokalzämie und Osteomalazie. Mit den Ausbruch des sekundären Hyperparathyroidismus wird die Nebenschilddrüse weniger reaktiv auf ihre hormonalen Regulatoren aufgrund der erniedrigten Expression seiner Calcium- und Vitamin D-Rezeptoren. Das Serum-Calcium nimmt ab. RO kann zu digitaler Gangrän, Knochenschmerzen, Knochenbrüchen und Muskelschwäche führen.

- [0006] Die Bestimmung von zirkulierenden biologisch aktiven PTH-Spiegeln bei Menschen war bisher eine Herausforderung. Ein Hauptproblem besteht darin, dass PTH bei niedrigen Spiegeln gefunden wird, normalerweise 10 pg/ml bis 65 pg/ml. Gekoppelt mit den extrem niedrigen zirkulierenden Spiegeln ist das Problem der Heterogenität von PTH und dessen vielen zirkulierenden Fragmenten. In vielen Fällen wurden die Immuntests durch die zirkulierenden PTH-Fragmente wesentlich und beträchtlich gestört. Beispielsweise weisen einige im Handel erhältliche PTH-Kits fast 100% Kreuzreaktivität mit dem Nicht-(1-84)-PTH-Fragment auf (vgl. den LePage-Artikel).

- [0007] Die PTH-Immuntests variierten über die Jahre. Ein früherer Ansatz ist ein doppelter Antikörper-Präzipitationsimmuntest, den man im U. S. 4,369,138 bei Arnold W. Lindall et alia. findet. Ein erster Antikörper weist eine hohe Affinität für ein (65-84)-PTH-Fragment auf. Ein radioaktiv markiertes (65-84)-PTH-Peptid wird der Probe mit dem ersten Antikörper zugegeben, um mit dem endogenen unmarkierten Peptid zu konkurrieren. Ein zweiter Antikörper wird zugegeben, der an den ersten Antikörper und den radioaktiv markierten PTH-Fragment-Komplex bindet, wobei ein Präzipitat erzeugt wird. Sowohl das Präzipitat als auch der Überstand können auf radioaktive Aktivität gemessen werden, und endogene PTH-Spiegel können daraus berechnet werden.

- [0008] Um die Störungen durch das PTH-Fragment zu überwinden, wurden immunradiometrische zweiseitige Tests auf intaktes PTH (I-PTH) eingeführt, wie der Allegro® Intact PTH-Test vom Nicol's Institute of San Juan Capistrano, Kalifornien. Bei einer Version bindet ein Fänger-Antikörper spezifisch den C-terminalen Anteil von hPTH, während ein anderer markierter Antikörper den N-terminalen Anteil des gefangenen hPTH bindet. In einem anderen Test wurden zwei monoclonale Antikörper verwendet, von denen beide an den N-terminalen Anteil von hPTH gebunden waren. Leider be-

stehen die Probleme bei diesen Tests darin, dass sie zwar das vollständige PTH und unvollständige PTH-Peptidfragmente messen, jedoch nicht zwischen ihnen unterscheiden. Dieses Unvermögen wird deutlich bei hyperparathyreoidalen Patienten und Patienten mit Nierenversagen, die wesentliche endogene Konzentrationen der großen, unvollständigen PTH-Fragmente aufweisen.

[0009] Vor kurzem führten Forscher einen spezifischen Bindungstest durch, der auf die großen N-terminalen PTH-Fragmente gerichtet war (Vgl. Gao, Ping et alia "Immunochemically luminometric assay with two monoclonal/antibodies against the N-terminal/sequence of human parathyroid hormone", Clinica Chimica Acta 245 (1996) 39-59). Bei diesem immunochemiluminometrischen Test werden zwei monoclonale Antikörper zum Nachweis von (1-34)-PTH-Fragmenten verwendet, jedoch keine PTH-Fragmente aus der Mitte oder C-terminale PTH-Fragmente. Ein Schlüsselfaktor bei der Konzeption dieser Tests ist, jede Reaktion mit C-terminalen PTH-Fragmenten auszuschalten.

#### OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren und Vorrichtungen zur direkten Bestimmung der Anwesenheit oder Menge des Cyclase-hemmenden Parathormons, das in einer klinischen Probe vorhanden ist. Derartige Bestimmungen sind nützlich, um parathyreoidale Erkrankungen wie Hyperparathyroidismus vom Normalzustand oder dem Zustand des Nichterkranktseins zu unterscheiden. Der Zielanalyt ist ein großes, unvollständiges Parathormon-Peptidfragment, das als Cyclase fungieren kann, indem es einen Parathormon-Antagonisten aktiviert. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird das herkömmlich bezeichnete PTH (das Peptid mit 84 Aminosäuren), als Cyclase-aktivierendes PTH (CAP) bezeichnet.

[0011] Die vorliegende Erfindung beinhaltet die Entdeckung, dass ein großes, unvollständiges PTH-Peptidfragment, ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz zwischen (SEQ ID Nr. 4 (PTH<sub>2-84</sub>)) und (SEQ ID Nr. 5 (PTH<sub>34-84</sub>)), in vivo als Antagonist von CAP fungiert. Mit anderen Worten, die Bindung von CAP an die PTH-Rezeptoren und die folgende biologische Aktivität werden durch die Anwesenheit dieses Cyclase-hemmenden PTH-Peptidfragments beeinflusst, hier als CIP bezeichnet. Die PTH-Rezeptoren können für CAP oder der CAP-Analoga unzugänglich gemacht werden, indem die PTH-Bindungsstelle durch CIP blockiert wird. Die Beziehung zwischen den Konzentrationen von CAP und CIP variiert mit den mit PTH in Beziehung stehenden Krankheitszuständen und ist somit für derartige Zustände bezeichnend. Genauso nützlich im Hinblick auf die Entdeckung der antagonistischen Natur von CIP betrifft die vorliegende Erfindung neue Verfahren und Vorrichtungen zur Überwachung der mit den Nebenschilddrüsen in Beziehung stehenden Knochenkrankungen und des sich daraus ergebenden Knochenverlusts oder -aufbaus. Erhöhte CIP-Mengen können die Calcium-freisetzende Aktivität von CAP oder die biologische Nettoaktivität hemmen, die eine gegebene Menge an CAP haben kann.

[0012] Bei der direkten Messung von CIP kann man einen Antikörper oder ein Antikörperfragment verwenden, der/das für eine Peptidsequenz für CIP spezifisch ist, die aufgrund der einzigartigen CIP-Proteinkonformation für die Antikörperbindung verfügbar ist; dieses gleiche Epitop ist jedoch nicht für die Antikörperbindung bei CAP aufgrund der einzigartigen CAP-Proteinkonformation in einer ausreichenden Menge verfügbar, um das vorhandene CIP zu binden und somit die Messung im Immuntest zu ermöglichen. Mit anderen Worten, die Konformationsänderungen zwischen CAP und CIP machen die CIP-Bindestelle auf CAP nicht verfügbar. Es wurde eine derartige Domäne identifiziert, die auf gegensätzliche Weise fungiert. Die Domäne von PTH 28-32 ist ein Epitop, das für die Antikörperbindung auf CAP, jedoch nicht auf CIP aufgrund der einzigartigen Proteinkonformationsunterschiede zwischen CAP und CIP verfügbar ist. Ein derartiger Antikörper oder ein derartiges Antikörperfragment kann in herkömmlichen Immuntestformaten entweder als Signal-Antikörper oder als Fänger-Antikörper verwendet werden. Derartige Antikörper können entweder monoclonaler oder polyclonaler Natur sein.

[0013] Um zwischen parathyreoidalen Krankheitszuständen und dem Normalzustand zu unterscheiden oder um die Wirkungen der therapeutischen Behandlung für parathyreoidale Krankheitszustände zu überwachen, kann man die Beziehung zwischen den CAP- und CIP-Werten vergleichen. Bei Patienten mit einem herkömmlichen "intakten" PTH-Wert von mehr als etwa 100 pg/ml sollte man den CIP-Wert bestimmen, da sich das Verhältnis von CAP zu CIP wesentlich zwischen einer normalen Person und einem Patienten mit einer parathyreoidalen Erkrankung und zwischen den verschiedenen Stadien der parathyreoidalen Erkrankungen unterscheidet.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] Fig. 1 ist eine graphische Darstellung des menschlichen CAP.

#### BESTE ART, DIE ERFINDUNG DURCHZUFÜHREN

[0015] Bei der Offenbarung der vorliegenden Erfindung sollte man sich daran erinnern, dass es zahlreiche sehr analoge, speziesabhängige Formen von PTH gibt. Die Aminosäuresequenz von hPTH wird in Fig. 1 dargestellt. Jedoch findet man beispielsweise für Ratten-PTH, Rinder-PTH oder Schweine-PTH die Substitutionen bei einigen der Aminosäuren in der hPTH-Sequenz. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann man untereinander austauschbare Antikörper oder Antikörperfragmente gegen Formen dieser PTHs verwenden, auch wenn die Verwendung eines Antikörpers mit einer Spezifität für PTH bevorzugt wird, das eine Sequenz besitzt, die der Spezies entspricht, in der die PTH-Messungen durchgeführt werden.

#### Immuntests auf Cyclase-hemmendes PTH

[0016] Ein erstes Verfahren zur Bestimmung von CIP in einer Probe umfasst drei Grundschriffe. Zuerst gibt man zu der Probe einen markierten monoclonalen oder polyclonalen Antikörper oder ein Antikörperfragment, der/das für eine Pep-

- tidsequenz für CIP spezifisch ist, die aufgrund der einzigartigen CIP-Proteinkonformation für die Antikörperbindung verfügbar ist; dieses gleiche Epitop ist jedoch nicht für die Antikörperbindung bei CAP aufgrund der einzigartigen Proteinkonformationsunterschiede zwischen CAP und CIP in einer ausreichenden Menge verfügbar, um das vorhandene CIP zu binden und somit die Messung im Immuntest zu ermöglichen. Vorzugsweise umfasst diese Domäne nicht die
- 5 Aminosäuresequenz PTH<sub>26-34</sub> (SEQ ID Nr. 1), vorzugsweise PTH<sub>28-32</sub> (SEQ ID Nr. 2), wobei mindestens vier Aminosäuren in dieser Sequenz Teil des antikörperreaktiven Abschnitts des Peptids sind. Die Bedingungen für derartige Reaktionen sind dem Fachmann gut bekannt. Zweitens lässt man den markierten Antikörper an jedes vorhandene CIP binden, wobei ein Komplex erzeugt wird. Drittens misst man die Menge des markierten Komplexes.
- [0017] Man kann dieses erste Verfahren durch Zugabe eines zweiten Antikörpers modifizieren, der an einen festen Träger gebunden ist und spezifisch an einen Abschnitt von CIP bindet, der anders ist als der des vorstehenden Antikörpers, wobei ein Antikörperkomplex erzeugt wird. Geeignete feste Träger schließen proteinbindende Oberflächen, kolloidale Metallpartikel, Eisenoxidpartikel, Latexpartikel und Polymerkügelchen ein. Außerdem kann man durch die Wahl geeigneter Antikörper einen Komplex erzeugen, der aus der Lösung präzipitiert.
- 10 [0018] Bei einem zweiten Verfahren zur Messung von CIP wird ein markierter Mehrfach-Antikörperkomplex verwendet. Ein erster Antikörper wird ähnlich wie der im ersten Verfahren in einer ausreichenden Menge verwendet, um das vorhandene CIP zu binden. (Der erste Antikörper kann an einen festen Träger gebunden sein). Den ersten Antikörper lässt man wiederum an jedes vorhandene CIP binden, wobei ein Komplex erzeugt wird. Ein zweiter Antikörper wird zugeben, an den ein markierungs- oder signalerzeugender Bestandteil gebunden ist und der spezifisch an einen Abschnitt von CIP bindet, der nicht die Anfangs-peptidsequenz ist, die an den ersten Antikörper bindet, und man lässt ihn an den
- 20 CIP-Komplex binden, wobei der Komplex markiert wird. Der zweite markierte Antikörper kann entweder nach oder gleichzeitig mit dem ersten Antikörper zugegeben werden. Schließlich misst man den markierten Komplex. (Man sollte beachten, dass die Reihenfolge dieser beiden Bindungsreaktionen umgekehrt werden kann).
- [0019] Fakultativ kann man den zweiten markierten Antikörper verwenden, um entweder den Mittelabschnitt von CIP oder den C-terminalen Anteil des CIP-Fragments zu binden, und man kann auch mindestens einen dritten Antikörper zugeben, der spezifisch an ein Epitop bindet, das offengeblieben ist, nachdem CIP an den ersten Antikörper und den zweiten Antikörper bindet, wobei ein Präzipitat erzeugt wird. Derartige Antikörper sind aus dem Fachgebiet bekannt. Es kann entweder der zweite oder der dritte Antikörper an einen festen Träger gebunden werden.
- 25 [0020] Ein drittes Verfahren zur Bestimmung von CIP in einer Probe umfasst einen Präzipitations- oder turbidometrischen Immuntest mit den folgenden drei Grundschritten. Zuerst gibt man der Probe einen Antikörper oder ein Antikörperfragment wie in dem ersten Verfahren in einer ausreichenden Menge zu, um das vorhandene CIP zu binden; jedoch kann der erste Antikörper an ein kolloidales Partikel oder eine Einheit gebunden werden, das/die zum Nachweis einer Signaländerung verwendet werden kann. Man lässt wiederum den Antikörper an jedes vorhandene CIP binden, wobei ein Komplex erzeugt wird. Schließlich misst man die Signaländerung aufgrund der Komplexbildung.
- 30 [0021] Geeignete Markierungen oder signalerzeugende Bestandteile für die vorstehenden Tests schließen herkömmlich bekannte chemilumineszierende Agentien, colorimetrische Agentien, energieübertragende Agentien, Enzyme, fluoreszierende Agentien und Radioisotope ein.
- [0022] Die vorliegende Erfindung schließt auch Kits für die CIP-Tests ein. Ein Kit enthält mindestens zwei Reagenzien, insbesondere einen im wesentlichen reinen Antikörper oder ein im wesentlichen reines Antikörperfragment, der/das für eine Peptidsequenz für CIP spezifisch ist, die aufgrund der einzigartigen CIP-Proteinkonformation für die Antikörperbindung verfügbar ist, aber dieses gleiche Epitop ist nicht für die Antikörperbindung bei CAP aufgrund der einzigartigen Proteinkonformationsunterschiede zwischen CAP und CIP verfügbar, und einen Markierungsbestandteil, der CIP bindet, aber nicht das vorstehende Antikörperpepitop. Dieser Kit kann wahlweise einen Antikörper enthalten, der für den C-terminalen Anteil von CIP spezifisch ist.
- 40 [0023] Ein zweiter CIP-Testkit umfasst einen ersten im wesentlichen reinen Antikörper oder ein erstes im wesentlichen reines Antikörperfragment, der/das für eine Peptidsequenz für CIP spezifisch ist, die aufgrund der einzigartigen CIP-Proteinkonformation für die Antikörperbindung verfügbar ist, wobei dieses gleiche Epitop ist jedoch nicht für die Antikörperbindung bei CAP aufgrund der einzigartigen Proteinkonformationsunterschiede zwischen CAP und CIP verfügbar, und einen zweiten Antikörper, der an CIP bindet, aber nicht an die vorstehende erste Antikörperdomäne, die an einen festen Träger gebunden ist. Dieser Kit kann wahlweise einen Antikörper enthalten, der für den C-terminalen Anteil von CIP spezifisch ist.
- 50 [0024] Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein immunradiometrischer Test (IRMA), der oft als Sandwich-Test bezeichnet wird. Die Elemente, die in einem derartigen Test verwendet werden, schließen einen Fänger-Antikörper, der an einen festen Träger gebunden ist, und einen Signal-Antikörper ein, an den eine radioaktive <sup>125</sup>I-Markierung gebunden ist. Typischerweise wählt man einen Fänger-Antikörper, der für Cterminale PTH-Fragmente spezifisch ist, während der Antikörper mit der Markierung für die CIP-Domäne spezifisch ist.
- 55 [0025] Man würde Ziel-Antikörper (monoclonal oder polyclonal) für eine Anzahl spezifischer Regionen oder Epitope entlang der CAP-Sequenz erzeugen. Ein Anteil jeder dieser Ziel-Antikörper würde man für den Nachweis markieren, beispielsweise mit radioaktivem Jod (<sup>125</sup>I). Ein CIP/CAP-Gemisch wird hergestellt, umfassend 1000 pg/ml CAP bzw. 1000 pg/ml CIP. Ein anderer Anteil jeder dieser gleichen Antikörper wird unter Verwendung herkömmlicher, aus dem Fachgebiet bekannter Verfahren an einen festen Träger wie kleine Polystyrol-Kügelchen gebunden. Nun bildet man eine Reihe von Permutationskombinationen, wobei man jeden markierten Ziel-Antikörper mit jedem Fänger-Ziel-Antikörper mischt. Die Kalibrierungslösung, die CAP und CIP enthält, wird in diesen Kombinationen für eine Zeitspanne inkubiert, die ausreicht, um die Erzeugung messbarer Komplexe zuzulassen. Man misst die markierten Komplexe, die Antikörper enthalten, die entweder an das in der CIP/CAP-Kalibrierungslösung vorhandene CAP oder CIP gebunden haben. Nur
- 60 messbare Komplexe werden für die Auswahl weiter in Betracht gezogen.
- [0026] Zwei getrennte zusätzliche Kalibrierungslösungen werden hergestellt. Es wird eine CIP-Kalibrierungslösung hergestellt, enthaltend 1000 pg/ml CIP. Eine CAP-Kalibrierungslösung wird hergestellt, enthaltend 1000 pg/ml CAP. Man identifiziert die in Frage kommenden Antikörperpaare aus den messbaren Komplexen, die aus den Paaren der mar-

kierten Ziel-Antikörper und Fänger-Ziel-Antikörper in Anwesenheit der CIP/CAP Kalibrierungslösung erzeugt werden. Jedes Paar wird mit der CIP-Kalibrierungslösung für eine Zeitspanne inkubiert, die ausreicht, um die Erzeugung messbarer Komplexe zuzulassen. Man misst die markierten Komplexe, die Antikörper enthalten, die an das CIP in der CIP-Kalibrierungslösung gebunden sind. Dann wird jedes in Frage kommende Paar mit der CAP-Kalibrierungslösung für eine Zeitspanne inkubiert, die ausreicht, um die Erzeugung messbarer Komplexe zuzulassen. Man misst die markierten Komplexe, die Antikörper enthalten, die an das in der CAP-Kalibrierungslösung vorhandene CAP gebunden wurden. Ein in Frage kommendes Paar, das CIP, aber nicht das CAP nachweist, besitzt mindestens einen der Antikörper im Paar, der an ein Epitop bindet, das zwischen CIP und CAP aufgrund der einzigartigen Proteinkonformationsunterschiede zwischen CAP und CIP unterscheidet. 5

[0027] Der Fachmann ist sich bewusst, dass in die vorliegende Erfindung jede Anzahl der bevorzugten vorstehend beschriebenen Merkmale einbezogen werden kann. 10

[0028] Alle Veröffentlichungen oder unveröffentlichten Patentanmeldungen, die hier erwähnt werden, werden hier durch Bezugnahme einbezogen.

[0029] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden hier nicht dargestellt, die für den Fachmann jetzt oder während des Zeitraumes einer Patenterteilung von dieser Patentbeschreibung offensichtlich sind, und sie liegen somit im Sinne und Rahmen der vorliegenden Erfindung. 15

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Cantor, Thomas L. 20

<120> Verfahren und Vorrichtung zur direkten Bestimmung des Cyclase-hemmenden Parathyroid-Hormons 25

<160> 5 30

<170> Microsoft Word 2000 – ASCII-Format 35

<210> 1 40

<211> 8 [Länge in ganzen Zahlen]

<212> PRT 45

<213> Menschliches Parathormon-Peptidfragment 50

<400> 1 55

Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe

1 5 60

<210> 2 65

<211> 5 [Länge in ganzen Zahlen]



# DE 102 36 631 A 1

<212> PRT

5 <213> Menschliches Parathormon-Peptidfragment

10 <400> 2

Leu Gln Asp Val His

15 1 5

20 <210> 3

25 <211> 84 [Länge in ganzen Zahlen]

30 <212> PRT

35 <213> Menschliches Parathormon-Peptidfragment

<400> 3

40 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu

1 5 10 15

45 Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp

20 25 30

50 Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp

55 35 40 45

60 Ala Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val

65

# DE 102 36 631 A 1

	50	55	60	
Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val				5
	65	70	75	
Asn Val Leu Thyr Lys Ala Lys Ser Gln				10
	80			
				15
<210> 4				20
<211> 83 [Länge in ganzen Zahlen]				25
<212> PRT				30
<213> Menschliches Parathormon-Peptidfragment				35
<400> 4				40
Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn				
1                      5                      10                      15				
Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val				45
	20	25	30	
				50
His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala				
	35	40	45	
				55
Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu				
	50	55	60	60
				65

# DE 102 36 631 A 1

Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val Asn

65

70

75

5

Val Leu Thyr Lys Ala Lys Ser Gln

80

10

<210> 5

15

<211> 51 [Länge in ganzen Zahlen]

20

<212> PRT

25

<213> Menschliches Parathormon-Peptidfragment

30

<400> 5

Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser

35

1

5

10

15

40

Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His

20

25

30

45

Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val Asn Val Leu

35

40

45

50

Thyr Lys Ala Lys Ser Gln

50

55

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Cyclase-inhibierenden Parathormons (CIP) in einer Probe, umfassend:
  - a) Zugabe eines markierten Antikörpers oder Antikörperfragments zu der Probe, der/das spezifisch ist für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet, in einer ausreichenden Menge, um das anwesende CIP zu binden;
  - b) Ermöglichen der Bindung des markierten Antikörpers an jedes anwesende CIP, wobei ein Komplex erzeugt wird; und
  - c) Messen der Menge an markiertem Komplex.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der markierte CIP-Antikörper oder das Antikörperfragment ein monoklonaler Antikörper oder ein polyclonaler Antikörper ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein zweiter Antikörper zugegeben wird, der an einen festen Träger gebunden

- ist und spezifisch an einen Abschnitt von CIP bindet, der anders ist, als der des markierten Antikörpers, wobei ein Komplex erzeugt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der feste Träger ausgewählt ist aus einer Protein-bindenden Oberfläche, kolloidalen Metallpartikeln, Eisenoxidpartikeln, Latexpartikeln und Polymerkügelchen.
5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Komplex aus der Lösung präzipitiert.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Markierung oder die Signalerzeugende Komponente ausgewählt ist aus Chemilumineszenz-Mitteln, kolorimetrischen Mitteln, Energietransfer-Mitteln, Enzymen, fluoreszierenden Mitteln und Radioisotopen.
7. Verfahren zur Messung der Menge an Cyclase-inhibierendem Parathormon (CIP)-Fragment in einer Probe, umfassend:
- a) Zugabe eines ersten Antikörpers oder Antikörperfragments zu der Probe, der/das spezifisch ist für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das verfügbar für Antikörperbindung in CIP ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet, in einer ausreichenden Menge, um das anwesende CIP zu binden;
  - b) Ermöglichen der Bindung des ersten Antikörpers an jedes anwesende CIP, wobei ein Komplex erzeugt wird;
  - c) Markieren des Komplexes mit Hilfe der Zugabe eines zweiten Antikörpers, der eine Markierung oder Signalerzeugende Komponente daran angelagert hat und der spezifisch an einen Abschnitt von CIP bindet, der anders ist als die ursprüngliche Peptidsequenz, die an den ersten Antikörper bindet, und Ermöglichen der Bindung des zweiten Antikörpers an den Komplex; und
  - d) Messen der Menge an markiertem Komplex.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der zweite markierte Antikörper nach oder gleichzeitig mit dem ersten Antikörper zugegeben wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der erste Antikörper an einen festen Träger gebunden ist.
10. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der zweite markierte Antikörper entweder an den Mittelabschnitt von CIP oder den C-Terminus von CIP bindet und das Verfahren weiterhin das Zugabe zumindest eines dritten Antikörpers umfasst, der spezifisch an ein Epitop bindet, das frei geblieben ist, nachdem CIP an den ersten Antikörper und den zweiten Antikörper bindet, wobei ein Präzipitat erzeugt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der C-terminale CIP-Antikörper an einen festen Träger gebunden ist.
12. Verfahren zum Messen des Cyclase-inhibierenden Parathormons (CIP) mit Hilfe eines präzipitierenden oder turbidometrischen Immuntests, umfassend:
- a) Zugabe eines ersten Antikörpers oder Antikörperfragments zu der Probe, der/das spezifisch ist für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet, in einer ausreichenden Menge, um das anwesende CIP zu binden, wobei der Antikörper an ein kolloidales Partikel oder Teil gebunden ist, das verwendet werden kann, um eine Signaländerung nachzuweisen;
  - b) Ermöglichen der Bindung des Antikörpers an jedes anwesende CIP, wobei ein Komplex erzeugt wird; und
  - c) Messen der Signaländerung, die durch die Erzeugung des Komplexes verursacht wird.
13. Im wesentlichen reine Antikörper- oder Antikörperfragment-Probe, markierter Antikörper oder Antikörperfragment, spezifisch für eine Peptidsequenz für Cyclase-inhibierendes Parathormon, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet.
14. Antikörper nach Anspruch 13, wobei der Antikörper ein monoklonaler oder ein polyclonaler Antikörper ist.
15. Kit, das Reagentien zum Durchführen eines Tests für Cyclase-inhibierendes Parathormon (CIP) enthält, umfassend:
- a) einen im wesentlichen reinen Antikörper oder Antikörperfragment, spezifisch für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht spezifisch ist für die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon; und
  - b) eine Markierungskomponente, die an CIP bindet, nicht aber an das CIP-Antikörper-Epitop, das von dem ersten Antikörper gebunden wird.
16. Kit nach Anspruch 15, weiterhin umfassend einen Antikörper, der spezifisch für den C-terminalen Abschnitt von CIP ist.
17. Kit, das Reagentien zum Durchführen eines Tests für Cyclase-inhibierendes Parathormon (CIP) enthält, umfassend:
- a) einen ersten, im wesentlichen reinen Antikörper oder Antikörperfragment, spezifisch für eine Peptidsequenz für CIP, die ein Epitop präsentiert, das für Antikörperbindung in CIP verfügbar ist, aber nicht an die gleiche Peptidsequenz im Cyclase-aktivierenden Parathormon bindet; und
  - b) einen zweiten Antikörper, der an CIP bindet, nicht aber an das erste CIP-Antikörper-Epitop, das an einen festen Träger gebunden ist.
18. Kit nach Anspruch 17, weiterhin umfassend einen Antikörper, der für den C-terminalen Abschnitt von CIP spezifisch ist.

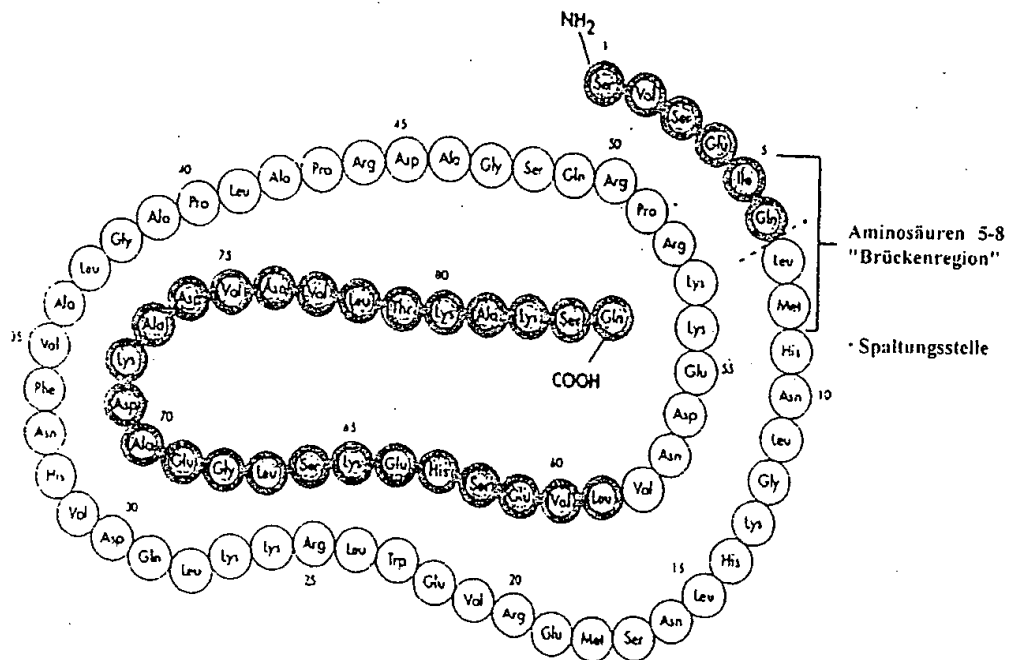
---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

# FIG. 1

## Vollständiges menschliches PTH (1-84)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**